

令和元年6月11日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07182

研究課題名(和文) 低温依存的雑種形成が切り拓く植物多様性研究の新展開

研究課題名(英文) Thermo-dependent hybridization will provide new insights for studies on how current plant diversity is established

研究代表者

山田 敏弘 (Yamada, Toshihiro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70392537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シダ類は、古くから異なる種間での交雑を伴う種分化を繰り返してきた。ところが、シダ類のゼンマイ科では、これまでに報告された雑種は、極めて少数である。また、ゼンマイ科では、約1.5億年にわたってゲノムサイズが変化していないことが指摘されており、過去においても雑種形成が制限されてきたと推定される。

本研究ではゼンマイ科において、複数の種が同所的に生育すること、生殖期が種間で重なること、実際に人工雑種が形成されることを示した。従って、ゼンマイ科の種間においては、受精後隔離機構が働いていると考えられ、本研究ではその機構として雑種崩壊の可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は雑種形成による種分化を頻繁に起こす。そのため、雑種形成が植物多様性の増大に大きく貢献したことは、古くから指摘されてきた。しかし、「どのような野外環境で雑種が形成されやすいのか？」について着目されたことはなかった。本研究では、ゼンマイ科のシダ類において雑種崩壊によって雑種形成が妨げられる可能性を示した。一方、雑種崩壊は温度依存的に起こることが知られている。このことは、温暖化などにより地球の気温が変化すると、既存の雑種が崩壊したり、逆に新たに形成されやすくなる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Monilophytes (ferns) have been repeatedly speciated through hybrid formations. On the contrary to other ferns, however, hybrids are quite rare in the Osmundaceae. In addition, genome sizes have been stable in the Osmundaceae since the Middle Jurassic (ca. 150 million years ago), thus there could be some mechanisms which hamper a hybrid formation in this family.

In this study, we showed in the Osmundaceae: 1) many species synaptically grow, 2) reproductive seasons are overlapped among species, 3) hybrid could be made by artificial crossing. Therefore, barrier for hybrid formation should be post-zygotic in the Osmundaceae. We hypothesized that the post-zygotic barrier would be a hybrid breakdown, which could be happened by loss of chromosome(s) derived from either of the parental species.

研究分野：進化古植物学

キーワード：雑種形成 温度 雑種崩壊 ゼンマイ科 シダ類

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞周期時間の違いによる生殖的障壁は、温度変化によって打破され得る

植物は雑種形成による種分化を頻繁に起こす。そのため、雑種形成が植物多様性の増大に大きく貢献したことは、古くから指摘されてきた。しかし、「どのような野外環境で雑種が形成されやすいのか？」について着目されたことはなかった。一方、過去に目を向けると、汎世界的に雑種形成が促進、あるいは抑制された時代があったかもしれない。しかし、野外で雑種形成が促進される環境条件が十分に理解されていないことが災いし、雑種進化の歴史性に関する研究はほぼ手つかずのままである。

野生植物の研究状況とは対照的に、栽培植物では、雑種形成を促進する培養条件や、それらに関連する細胞学的メカニズムが非常に良く理解されている。例えばオオムギ属では、通常は胚が育たない細胞周期時間（細胞周期1周あたりの時間）が違う種どうしの交雑であっても、低温で培養すると雑種が形成されやすい。オオムギ属の異種を交雑した場合、雑種第一代（F1）の胚における体細胞分裂は、両親種のうち分裂速度が早い種のペースで進行する。そのため、分裂速度が早い種由来の染色体が娘細胞への移動を開始しても、遅い種由来の染色体では移動の準備が整っていない。すると、分裂速度が遅い種由来の染色体は胚の体細胞から次第に脱落し、胚形成が停止する（雑種崩壊）。一方、低温で胚を培養すると、細胞分裂速度が鈍化し、両親由来の染色体の挙動が同調する。そのため、胚から片方種のゲノムが脱落しなくなり、F1形成が正常に進行する。

細胞周期を制御するメカニズムは、真核生物に共通する。また、栽培植物では系統的に多様な分類群で温度依存的に雑種形成が起きる。従って、温度依存的雑種形成は維管束植物に共通した現象である可能性が極めて高い。しかし、野生植物における温度と雑種形成の関わりはこれまで見過ごされてきた。

(2) 温度依存的雑種形成をゼンマイ科で実証できるか？

異種間交雑に由来するF1は、異なる半数性ゲノムを1セットずつ持つ。すると、F1は減数分裂を正しく終えられず、多くの場合、不稔となる。従って、雑種形成で種分化が起きることは、生物一般に極めて稀である。一方、維管束植物においては、F1で非減数配偶子形成が起きるなどして、稔性を回復した子孫が頻繁に現れる。維管束植物の中でこの傾向が最も顕著なのは、シダ類である。また、シダ類の染色体数は他の維管束植物に比べ桁外れに多い。これは、過去において異種間交雑と非減数配偶子形成を繰り返した結果と解釈されている。

ところが、シダ類のゼンマイ科では、これまでに報告された雑種は、F1と推定されるものを含め、極めて限られている。また、ゼンマイ科では、約1.5億年にわたってゲノムサイズが変化していないことが指摘されており、過去においても雑種形成が制限されてきたと推定される。ゼンマイ科においては、複数の種が同所的に生育することがよくあり、胞子形成時期も種間で大きくは異ならない。従って、時空間的な生殖的隔離によって雑種形成を回避しているとは考えにくい。すると、ゼンマイ科において働き得る生殖的隔離機構は、異種間受精の回避、雑種崩壊であると予想できる。しかし、これまで少数ながら雑種が報告されていることから、私たちは雑種崩壊が生殖隔離機構の正体であると予想した。また、雑種が限られた地域にだけ分布する事実は、「生育に適した温度域でしか雑種が生きられないこと」と関係するかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではゼンマイ科の植物を用いて「種間の主たる生殖的隔離機構は雑種崩壊である」という仮説を検証することを目指した。また、「雑種ができた場合、適温域（＝両親種の細胞周期時間が同調する温度）のみで雑種が生存できる」可能性についても検討した。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、ゼンマイ科植物を用いて以下の研究を行なった。

(1) 細胞周期時間を種間で比較

ゼンマイ、レガリスゼンマイ、シロヤマゼンマイ、ヤマドリゼンマイについて、配偶体にチミジン類似物質であるEdUを与え、EdUを取り込んだ細胞数の時間変化から細胞周期時間を推定した。また、細胞周期時間は各種とも20、25、30°Cについて調査した。

(2) 配偶体の発生速度を種間で比較

前述の通り、ゼンマイ科植物においては、胞子形成時期に種間で大きな違いはない。しかし、胞子発芽後成熟するまでの時間が種間で異なる場合、受精前障壁となる可能性がある。そこで、発芽から生殖器形成までの時間を、20、25、30°Cの場合について、ゼンマイ、レガリスゼンマイ、シロヤマゼンマイ、ヤマドリゼンマイで比較した。

(3) 種間で人工交雑を行い、受精可能性を検討

ゼンマイとシロヤマゼンマイの間で人工交雑を行い、雑種形成を確認する。なお、交雑および形成された幼体の育成は、上述(1)の実験で推定された適温域で行うこととした。

(4) 人工雑種個体の雑種崩壊実験

上記(3)で作出した人工雑種個体を非適温域で培養し、雑種崩壊が生じるのかを観察する（現在も実験を継続中）。

4. 研究成果

上述の4種間で細胞周期時間の比較を試みたが、30℃で培養した場合、レガリスゼンマイが枯死することがわかった。この現象は、植物の分布を考える上で重要な意味を持つと思われるため、後述するように原因をさらに追求した。

細胞周期時間の比較については、残り3種間で行なった。その結果、ゼンマイとヤマドリゼンマイは20℃で、ゼンマイとシロヤマゼンマイは25℃で、それぞれ細胞周期時間が同調した。しかし、ゼンマイとヤマドリゼンマイを比較した場合、25℃、30℃における細胞周期時間は何もゼンマイが早かった。一方、ゼンマイとシロヤマゼンマイでは、20℃においてはシロヤマゼンマイが、30℃においてはゼンマイが早かった。なお、シロヤマゼンマイとヤマドリゼンマイが同調する温度は見出せなかった。

次に、種間で生殖器形成までの時間を比較したところ、最大で10日程度の差が認められた。しかし、ゼンマイ科植物の孢子形成期を個体群内で比較すると、最大で1ヶ月程度のばらつきがある。従って、生殖器形成までの時間差は孢子形成期のばらつきによって十分に相殺されると考えられ、種間での時間的隔離はないものと推定された。

(1) レガリスゼンマイにおける高温枯死の原因を解明した

レガリスゼンマイは世界の温帯～熱帯にかけて分布する側系統種で、ゼンマイを含み1つのクレードを作る。しかし、分布範囲の広さは系統ごとに異なり、狭いもの（インド系統）と、広いもの（ユーロアフリカ系統、新世界系統）とがある。

本研究では、生育温度とレガリスゼンマイの分布との関係を推定するため、レガリスゼンマイ（インド系統、ユーロアフリカ系統、新世界系統）とゼンマイについて、配偶体を25℃、30℃で培養し、それらの生育状況および生存率を比較した。すべての系統において、配偶体は25℃では正常に発生し、生存率は90%以上だった。一方、30℃で培養すると、分布範囲の広いユーロアフリカ系統および新世界系統やゼンマイでは、約80%の個体が生存した。ところが、分布範囲の狭いインド系統のみ、100%近くが白化して枯死した。この枯死様式は、インド系統の温度感受性に、母系遺伝する葉緑体が関与していることを想起させた。そこで、インド系統で起きた高温致死が葉緑体の特性に起因するのかを推定するため、♀インド系統 × ♂ゼンマイの異質4倍体雑種アイノコゼンマイの配偶体を25℃と30℃で培養した。その結果、アイノコゼンマイの配偶体は母系種のインド系統と同様、25℃では正常に生育したが、30℃では100%近くが枯死した。

さらに、葉緑体に起因する高温枯死と光障害との関係を調べるため、インド系統、ゼンマイ、アイノコゼンマイの配偶体を、暗所の25℃、30℃で培養した（培地に栄養源としてスクロースを添加）。その結果、25℃でも30℃でも、どの系統の配偶体も枯死しなかった。従って、インド系統とアイノコゼンマイの配偶体における高温枯死は、光障害によって引き起こされる可能性が示唆された。

以上の結果は、高温に対する負の感受性が葉緑体を介して母系遺伝することを支持した。また、葉緑体の高温感受性が低いほど、分布が広いと推定された。一見すると適応的に見えない高温枯死性が、なぜ維持されているのかは謎であるが、今後、その意義についてさらに検討する必要があると思われる。

(2) ゼンマイとシロヤマゼンマイの人工雑種を作出した

上述の実験の結果、ゼンマイとシロヤマゼンマイの細胞周期時間は25℃で同調することが明らかとなった。そこで、両種が機械的に受精できない可能性を排除するため、25℃において、ゼンマイ（♀）×シロヤマゼンマイ（♂）およびその逆交雑を人工的に行なった。ここでは、得られた孢子体の葉形態によって一次選抜を行なった後、核DNAマーカーによって雑種性の確認を行なった。

その結果、シロヤマゼンマイ（♀）×ゼンマイ（♂）の組み合わせで、4個体の人工交雑雑種を得た。人工雑種の孢子体の第1-4葉は、質感がゼンマイに似た草質であるのに対し、葉縁はシロヤマゼンマイのように鋸歯がみられた。第5および6葉は、両親種のように三出複葉で、羽片の葉縁にはシロヤマゼンマイのように鋸歯や切れ込みが無く、ゼンマイのように全



同所的に生育する
ゼンマイ（下）と
シロヤマゼンマイ（上）

縁になった。第7葉以降では、シロヤマゼンマイのように羽片に切れ込みが入り始めるが、ゼンマイのように葉縁がほぼ全縁であった。つまり、人工交雑雑種は両親種の間間的な形態を持った。

本研究の結果は、ゼンマイとシロヤマゼンマイの間には機械的にも生殖的隔離が働いていないことを示唆する。九州南部では両種が同所的に生育するが、九州南部における両種の孢子発芽期の平均気温（5-6月）は25℃前後である。従って、両種の間では雑種が形成され得るが、野外における雑種の発見には至っていない。このことは、形成された雑種F1が短命で、受精後に訪れる夏の高温期に雑種崩壊により枯死してしまうことに起因しているのかもしれない。この可能性を確かめるため、現在、雑種個体を30℃（ないし20℃）で培養し、雑種崩壊が起きるかを観察する実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 6件）

- 1) 上嶋智大, 堤千絵, 小藤累美子, 山田敏弘. ゼンマイとシロヤマゼンマイの人工交配雑種. 日本植物分類学会第18回大会(八王子). 2019年3月.
- 2) 上嶋智大, 堤千絵, 小藤累美子, 山田敏弘. レガリスゼンマイに見られる高温枯死の原因. 日本植物分類学会第17回大会(金沢). 2018年3月.
- 3) 上嶋智大, 堤千絵, 小藤累美子, 山田敏弘. 葉緑体の温度適性がレガリスゼンマイの分布に与える影響. 日本植物学会第81回大会(野田). 2017年9月.
- 4) 上嶋智大, 堤千絵, 小藤累美子, 山田敏弘. 葉緑体の温度適性がレガリスゼンマイの分布に与える影響. 植物地理・分類学会2017年度大会(金沢). 2017年5月.
- 5) 上嶋智大, 堤千絵, 小藤累美子, 山田敏弘. ゼンマイ科植物における温度依存的な生殖的隔離. 日本植物分類学会第16回大会(京都). 2017年3月.
- 6) 上西真由, 小藤累美子, 堤千絵, 海老原淳, 山田敏弘. 温度がゼンマイ属植物の生殖的隔離に与える影響の解析. 日本植物分類学会第15回大会(富山). 2016年3月.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：海老原 淳

ローマ字氏名：EBIHARA, Atsushi

所属研究機関名：独立行政法人国立科学博物館

部局名：植物研究部

職名：研究主幹

研究者番号（8桁）：20435738

研究分担者氏名：堤 千絵

ローマ字氏名：TSUTSUMI, Chie

所属研究機関名：独立行政法人国立科学博物館

部局名：植物研究部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：30455422

研究分担者氏名：小藤 累美子

ローマ字氏名：KOFUJI, Rumiko

所属研究機関名：金沢大学

部局名：自然システム学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：40324066

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。